

PCTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 9/50, 9/51	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/33820 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09545 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Dezember 1999 (07.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 56 432.5 8. Dezember 1998 (08.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <u>HEGER</u> , Robert [DE/DE]; Liegnitzerstrasse 3, D-69124 Heidelberg (DE). <u>AUWETER</u> , Helmut [DE/DE]; Lessingstrasse 35, D-67117 Limburgerhof (DE). <u>BREITENBACH</u> , Jörg [DE/DE]; Hans-Sachs-Ring 95A, D-68199 Mannheim (DE). <u>BOHN</u> , Heribert [DE/DE]; Jakob-Ries-Strasse 10, D-67319 Wattenheim (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: NANOPARTICULATE CORE-SHELL SYSTEMS AND USE THEREOF IN PHARMACEUTICAL AND COSMETIC PREPARATIONS (54) Bezeichnung: NANOPARTIKULÄRE KERN-SCHALE SYSTEME SOWIE DEREN VERWENDUNG IN PHARMAZEUTISCHEN UND KOSMETISCHEN ZUBEREITUNGEN (57) Abstract <p>Nanoparticulate preparations of pharmaceutical and cosmetic active substances with a core-shell structure, whereby the active substance is present in an X-ray amorphous form, together with a polymer matrix and the shell consists of a stabilizing sheathing matrix.</p> (57) Zusammenfassung <p>Nanopartikuläre Zubereitungen von pharmazeutischen und kosmetischen Wirkstoffen mit einer Kern-Schale Struktur, in denen der Wirkstoff im Kern röntgenamorph zusammen mit einer Polymermatrix vorliegt und die Schale aus einer stabilisierenden Hüllmatrix besteht.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Nanopartikuläre Kern-Schale Systeme sowie deren Verwendung in pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft nanopartikuläre Zubereitungen von pharmazeutischen Wirkstoffen mit einer Kern-Schale-Struktur, wobei der Wirkstoff im Kern in röntgenamorpher Form zusammen mit
10 mindestens einem Polymer vorliegt und die Schale aus einer polymeren Hüllmatrix besteht.

Aus der EP-A 425 892 ist ein Verfahren zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von pharmazeutischen Wirkstoffen mit Peptid-
15 bindungen bekannt, wobei eine Lösung des Wirkstoffs in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel mit einem wässrigen Kolloid schnell vermischt wird, sodaß der Wirkstoff in kolloid-disperser Form ausfällt.

20 In der EP-A 276 735 sind schutzkolloidumhüllte Wirkstoff-Partikel beschrieben, in denen der Wirkstoff in einer Ölphase dispergiert vorliegt. In Ölphasen treten jedoch häufig Probleme bezüglich der Kompatibilität auf.

25 Aus der EP-A-0169 sind partikuläre pharmazeutische Zubereitungen schwer wasserlöslicher Substanzen bekannt, wobei die Zubereitungen durch Ausfällen aus einer Lösung des Wirkstoffs nach Zugabe einer Fällungslösung erhalten werden.

30 In der WO 93/10767 sind perorale Applikationsformen für Peptid-arzneimittel beschrieben, in denen das Arzneimittel in der Weise in eine Gelatinematrix eingebaut wird, daß die sich bildenden kolloidalen Teilchen ladungsneutral vorliegen. Nachteilig an solchen Formen ist jedoch deren Neigung zum Ausflocken.

35 In der EP-A 0605 497 sind Nanopartikel beschrieben, in denen der Wirkstoff in einer Lipidmatrix stabilisiert ist. Allerdings sind Lipidmatrizes labil gegen Scherkräfte, was bei der Weiterverarbeitung Probleme bereiten kann.

40 In der DE-A 4440337 ist die Herstellung von mit Tensiden stabilisierten Nanosuspensionen beschrieben. Hohe Tensidkonzentrationen sind jedoch unter Umständen physiologisch bedenklich.

45 In der US 5,145,684 und der US 5,399,363 ist die Herstellung kristalliner Nanopartikel durch spezielle Mahlverfahren beschrieben. Kristalline Nanopartikel weisen jedoch im allgemeinen eine

schlechtere Bioverfügbarkeit auf und können zudem aufgrund des Polymorphismus einiger Wirkstoffe Probleme bereiten.

- US 4,826,689 beschreibt ein Präzipitationsverfahren, bei dem
- 5 amorphe sphärische Partikel erhalten werden, die durch keine weiteren Zusatz oder nur geringe Zusätze an Tensiden stabilisiert werden. Die Scherstabilität solcher Systeme und die Möglichkeit zur Sterilisation ist gering.
- 10 Die EP-A 275,796 beschreibt die Herstellung kolloidaler dispergierbarer Systeme mit sphärischen Partikel kleiner als 500 nm, wobei es sich nicht um eine Kern-Schale-Struktur, sondern um eine Matrix-Struktur handelt.
- 15 Die WO 97/14407 beschreibt die Herstellung von Nanopartikeln durch Expansion aus einem Lösungsmittel in ein komprimiertes Gas, Flüssigkeit oder ein superkritisches Fluidum in Gegenwart eines Amphiphilen.
- 20 Die DE 3742 473 C2 beschreibt Hydrosole von festen Teilchen eines Cyclosporins und einem Stabilisator, der den Zerteilungsgrad der Teilchen aufrecht erhält. Die Teilchengröße dieser Hydrosole liegt im kolloidalen Bereich. Insbesondere wird darauf hingewiesen, daß die beschriebenen Hydrosolteilchen aus Wirkstoffmasse
- 25 bestehen.

- Nachteilig an diesen Hydrosolen ist jedoch, daß die Teilchengröße der Hydrosolpartikel im Laufe der Zeit stark zunimmt. Dies gilt insbesondere dann, wenn die dispergierende Phase des Hydrosols
- 30 Wirkstofflösungsmittel enthält. Dieses Wirkstofflösungsmittel wird bei der Herstellung der Hydrosolteilchen zwingend eingesetzt und muß danach möglichst schnell entfernt werden.

- Das Anwachsen der Hydrosolteilchen ist auf die sog. Ostwaldreifung zurückzuführen, bei der über die dispergierende Phase Wirkstoffmoleküle von kleinen Hydrosolteilchen zu großen Hydrosolteilchen transportiert werden. D.h. kleinere Teilchen lösen sich langsam auf und größere Teilchen wachsen langsam an. Da der Wirkstoff Cyclosporin eine geringe Restlöslichkeit auch in lösungs-
- 35 mittelfreiem Wasser aufweist, kann ein Anwachsen der Hydrosolteilchen auch dort nicht verhindert werden.
- 40

- Hinsichtlich der Stabilität der nanopartikulären Systeme, des Vorliegens des Wirkstoffs in stabiler amorpher Form und der brei-
- 45 ten Anwendbarkeit in einer Vielzahl von pharmazeutischen Darreichungsformen bestand jedoch noch Raum für Verbesserungen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, verbesserte wirkstoffhaltige nanopartikuläre Zubereitungen zu finden.

- Demgemäß wurden die erfindungsgemäßen nanopartikulären Zubereitungen pharmazeutischer Wirkstoffe gefunden, welche eine Kern-Schale-Struktur aufweisen, wobei im Kern der Wirkstoff in röntgenamorpher Form in einer Polymermatrix vorliegt, und die Schale aus einer stabilisierenden Hüllmatrix eines Polymers mit Schutzkolloid-Eigenschaften besteht.
- 10 Bevorzugt liegen im Kern mindestens zwei getrennte Phasen vor, wobei die eine Phase aus diskreten, röntgenamorphen Partikeln des Wirkstoffs in besteht, während die andere Phase eine molekular-disperse Verteilung des Wirkstoffs in einem oder mehreren Polymeren darstellt. Ob der Kern ein- oder zweiphasig ist, hängt im wesentlichen vom Mengenverhältnis Kernpolymere zu Wirkstoff ab.
- Entscheidend ist, das mit abnehmender Partikelgröße des Wirkstoffs der Lösedruck der Substanz zunimmt. Daraus resultiert eine
- 20 erhöhte Sättigungslöslichkeit. Die erhöhte Sättigungslöslichkeit führt nach Noyes-Whitney zur Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit. Hinzu kommt, das in den erfindungsgemäßen Formulierungen die biologisch aktive Substanz in einem energetisch instabilen, metastabilen Zustand vorliegt. Wird nun das Nanopartikel nicht
- 25 ausreichend stabilisiert kann dies in einigen Fällen zu spontaner Kristallisation führen, der Wirkstoff präzipitiert aus der stabilisierten Form heraus.
- Deshalb wurde auch nach Lösungen gesucht, neben einer stabilen
- 30 Schalestruktur, die auch Vorgängen wie dem Einmischen in Cremes oder Salben, dem homogenisieren in kosmetischen Präparationen und den Druck- und Scherbelastungen bei der Sterilisation standhält.
- Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen kolloidalen
- 35 Wirkstoff-Zubereitungen im Gegensatz zu bekannten Wirkstoff-Zubereitungen, welche im Kern der kolloidalen Teilchen im wesentlichen ausschließlich aus Wirkstoffmasse bestehen, ein deutlich niedrigeres Wachstum der Hydrosol-Teilchen. Eine Stunde nach Herstellung der wässrigen Hydrosole in Gegenwart eines den Wirkstoff
- 40 lösenden Lösungsmittels, ist das Teilchenwachstum um einen Faktor von 4 bis 10 geringer. Bei wässrigen Hydrosolen, die kein den Wirkstoff lösendes Lösungsmittel enthalten, ist das Teilchenwachstum um einen Faktor von 1,5 - 5 reduziert.
- 45 Die in der erfindungsgemäßen Wirkstoff-Zubereitung vorliegenden kolloidalen Partikel besitzen eine Polymerhülle, die den Kern der Partikel umhüllen. Aufgabe dieser Polymerhülle ist es, die Parti-

kel in ihrem kolloidalen Zustand gegen heterogenes Teilchenwachstum (Aggregation, Flockung etc.) zu stabilisieren.

Darüberhinaus besitzen die in der erfindungsgemäßen Wirkstoff-

- 5 Zubereitung vorliegenden kolloidalen Partikel einen Kern aus Wirkstoff und Polymer. Der Wirkstoff im Innern dieses Kerns liegt in röntgenamorpher Form vor. Wesentlich ist, daß keine kristallinen Wirkstoff-Anteile in der Wirkstoff-Zubereitung nachweisbar (Röntgenbeugung) sind. Insbesondere tragen die Polymere im Inneren der Teilchen dazu bei, den Wirkstoff in seinem nicht kristallinen Zustand zu erhalten, sowie die kolloidalen Strukturen in Bezug auf homogenes Teilchenwachstum (Ostwald-Reifung) zu stabilisieren.
- 10
- 15 Als polymere Stabilisatoren für die Hüllmatrix der Schale eignen sich erfindungsgemäß quellbare Schutzkolloide wie beispielsweise Rinder-, Schweine- oder Fischgelatine, Stärke, Dextrin, Pektin, Gummiarabicum, Ligninsulfonate, Chitosan, Polystyrolsulfonat, Alginate, Kasein, Kaseinat Methylcellulose, Carboxymethyl-
- 20 cellulose, Hydroxypropylcellulose, Milchkpulver, Dextran, Vollmilch oder Magermilch oder Mischungen dieser Schutzkolloide. Weiterhin eignen sich Homo- und Copolymere auf Basis folgender Monomeren: Ethylenoxid, Propylenoxid, Acrylsäure, Maleinsäureanhydrid, Milchsäure, N-Vinylpyrrolidon, Vinylacetat, α - und β -
- 25 Asparaginsäure. Besonders bevorzugt wird eine der genannten Gelatine-Typen eingesetzt, insbesondere sauer oder basisch abgebaute Gelatine mit Bloom-Zahlen im Bereich von 0 bis 250, ganz besonders bevorzugt Gelatine A 100, A 200, B 100 und B 200 sowie niedermolekulare, enzymatisch abgebaute Gelatinetypen mit der
- 30 Bloom-Zahl 0 und Molekulargewichten von 15.000 bis 25.000 D wie zum Beispiel Collagel A und Gelitasol P (Firma Stoess, Eberbach) sowie Mischungen dieser Gelatine-Sorten.

Weiterhin enthalten die Zubereitungen niedermolekulare ober-

- 35 flächenaktive Verbindungen. Als solche eignen sich vor allem amphiphile Verbindungen oder Gemische solcher Verbindungen. Grundsätzlich kommen alle Tenside mit einem HLB-Wert von 5 bis 20 in Betracht. Als entsprechende oberflächenaktive Substanzen kommen beispielsweise in Betracht: Ester langkettiger Fettsäuren mit
- 40 Ascorbinsäure, Mono- und Diglyceride von Fettsäuren und deren Oxyethylierungsprodukte, Ester von Monofettsäureglyceriden mit Essigsäure, Zitronensäure, Milchsäure oder Diacetylweinsäure, Polyglycerinfettsäureester wie z.B. das Monostearat des Triglycerins, Sorbitanfettsäureester, Propylenglykolfettsäureester, 2-
- 45 (2'-stearoyllactyl)-milchsaure Salze und Lecithin. Bevorzugt bevorzugt wird Ascorbylpalmitat eingesetzt.

Als polymere Bestandteile, die sich im Kern der Partikel der erfindungsgemäßen Wirkstoffzubereitung befinden eignen sich prinzipiell alle Polymere, die in einem Temperaturbereich zwischen 0 und 240°C, einem Druckbereich zwischen 1 und 100 bar, einem pH-Bereich von 0 bis 14 oder Ionenstärken bis 10 mol/l nicht oder nur teilweise in Wasser oder wässrigen Lösungen oder Wasser-Lösungsmittelgemischen löslich sind.

Nicht oder nur teilweise löslich bedeutet in diesem Zusammenhang, daß der 2. Virialkoeffizient für das oder die Polymere in Wasser oder einem Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel Werte kleiner Null annehmen kann. (vgl. M. D. Lechner, "Makromolekulare Chemie", Birkhäuser Verlag, Basel, S. 170 - 175). Der 2. Virialkoeffizient, der eine Aussage über das Verhalten eines Polymers in einem Lösungsmittel(gemisch) macht, kann experimentell bestimmt werden, beispielsweise durch Lichtstreuungsmessung oder Bestimmung des osmotischen Drucks. Die Dimension dieses Koeffizienten ist (mol⁻¹)/g².

Es können ein oder mehrere Polymere eingesetzt werden. Die Molmassen der verwendeten Polymere liegen im Bereich von 1000 - 10000000 g/mol, bevorzugt im Bereich 1000 - 1000000 g/mol. Grundsätzlich kommen alle für den Anwendungsbereich Pharma und Kosmetik geeigneten Polymere in Betracht.

Von besonderem Interesse sind Polymere, die in organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln löslich sind, und bei Temperaturen zwischen 0 und 240 °C nicht oder nur teilweise in Wasser oder wässrigen Lösungen oder Wasser-Lösungsmittelgemischen löslich sind. Folgende Polymere sind beispielhaft genannt, ohne jedoch einschränkend zu sein:

Poly(vinylether) wie z.B. Poly(benzyloxyethylen), Poly(vinylacetale), Poly(vinylketone), Poly(allylalkohol), Poly(vinylester) wie z.B. Poly(vinylacetat), Poly(oxytetramethylen), Poly(glutardialdehyd), Poly(carbonate), Poly(ester), Poly(siloxane), D,L-Poly(lactid), Poly(lactid), Poly(glycolid), Poly(D,L-lactid-co-glycolid), Poly(amide), Poly(piperazine), Poly(anhydride) wie z.B. Poly(methacrylanhydrid), Gutta Percha, Celluloseether wie z.B. Methylcellulose (Substitutionsgrad 3 - 10 %), Ethylcellulose, Butylcellulose, Cellulose-Ester, wie z.B. Celluloseacetat oder Stärken. Insbesondere Copolymere und Blockcopolymere der Monomere der oben genannten Polymere. Weiterhin Copolymere und Blockcopolymere von Polyestern und Hydroxycarbonsäuren und linear- und Star-Polyethylenglycol, z.B. AB- und ABA-Blockcopolymere aus D,L-Poly(lactid) und Polyethylenglycol bzw. Poly(glycolid).

6

Von besonderem Interesse sind weiterhin Polymere, die bei Temperaturen zwischen 0 und 240 °C in Wasser oder wäßrigen Lösungen oder Wasser-Lösungsmittelgemischen eine obere und/oder untere Mischungslücke besitzen, d.h. durch Erhöhung bzw. Erniedrigung
5 der Temperatur können diese Polymere aus entsprechenden Lösungen ausgefällt werden. Folgende Polymere sind beispielhaft genannt, ohne jedoch einschränkend zu sein:

- Poly(acrylamide), Poly(methacrylamide) wie z.B.
- 10 Poly(N-isopropylacrylamid), Poly(N,N-dimethylacrylamid), Poly(N-(1,1-dimethyl-3-oxobutyl)acrylamid), Poly(methoxyethylen), Poly(vinylalkohole), acetylierte Poly(vinylalkohole), Poly(oxyethylen), Cellulose-Ether wie z.B. Methylcellulose (20 - 40 % Substitutionsgrad), Isopropylcellulose,
- 15 Cellulose-Ester, Stärken, modifizierte Stärken wie z.B. Methylether-Stärke, Gum Arabic, sowie Copolymere bzw. Blockcopolymere aus monomeren der oben genannten Verbindungen. Insbesondere AB- oder ABA-Blockcopolymere auf der Basis Ethylenoxid und Propylenoxid, z.B. Poloxamere wie Poloxamer 188
- 20 und Poloxamer 407.

Von besonderem Interesse sind weiterhin Polymere, die bei Temperaturen zwischen 0 und 240 °C in Wasser oder wäßrigen Lösungen oder Wasser-Lösungsmittelgemischen durch Variation des pH-Wertes
25 oder der Ionenstärke aus entsprechenden Lösungen ausgefällt werden können. Folgende Polymere sind beispielhaft genannt, ohne jedoch einschränkend zu sein:

- Alginate, Chitosan, Chitin, Schellak, Polyelektrolyte,
- 30 Poly(acrylsäure), Poly(metacrylsäure), Poly(methacrylester) mit mit sekundären tertiären oder quaternären Aminogruppen, insbesondere Copolymere oder Blockcopolymere auf der Basis verschiedener Acrylate, Methacrylate, Methacrylsäure, Acrylsäure, z.B. ein Copolymer aus Methacrylsäure/Methacrylsäureester (Gewichts-
- 35 verhältnis MAS/MAE 1:1 oder 1:2) oder ein Copolymer aus Dimethylaminoethylmethacrylat und Methacrylsäureester im Gewichtsverhältnis 1:1 (Eudragit®-Typen).

- Die Mengen der verschiedenen Komponenten werden erfindungsgemäß
- 40 so gewählt, daß die Zubereitungen 0,1 bis 70 Gew.-%, vorzugsweise 1 bis 40 Gew.-%, an Wirkstoff, 1 bis 80 Gew.-%, bevorzugt 10 bis 60 Gew.-% eines oder mehrerer polymerer Stabilisatoren (Hüllpolymer), 0.01 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise 0.1 bis 30 Gew.-% eines oder mehrerer Polymere für den Kern, und 0 bis 50 Gew.-%, bevor-
- 45 zugt 0,5 bis 10 Gew.-% eines oder mehrerer niedermolekularer

Stabilisatoren enthält. Die Gewichtsprozentangaben beziehen sich auf ein Trockenpulver.

- Zusätzlich können die Zubereitungen noch Antioxidantien und/oder
- 5 Konservierungsmittel zum Schutz des Wirkstoffs enthalten. Geeignete Antioxidantien oder Konservierungsstoffe sind beispielsweise α -Tocopherol, t-Butyl-hydroxytoluol, t-Butylhydroxyanisol, Lecithin, Ethoxyquin, Methylparaben, Propylparaben, Sorbinsäure, Natriumbenzoat oder Ascorbylpalmitat. Die Antioxidantien bzw.
- 10 Konservierungsstoffe können in Mengen von 0 bis 10 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der Zubereitung, enthalten sein.

- Weiterhin können die Zubereitungen noch Weichmacher zur Erhöhung der Stabilität des Endprodukts enthalten. Geeignete Weichmacher
- 15 sind beispielsweise Zucker und Zuckeralkohole wie Saccharose, Glukose, Laktose, Invertzucker, Sorbit, Mannit, Xylit oder Glycerin. Bevorzugt wird als Weichmacher Laktose eingesetzt. Die Weichmacher können in Mengen von 0 bis 50 Gew.% enthalten sein.
- 20 Weitere galenische Hilfsmittel wie Bindemittel, Sprengmittel, Geschmacksstoffe, Vitamine, Farbstoffe, Netzmittel, den PH-Wert beeinflussende Zusätze (vgl. H.Sucker et al., Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart 1978) können ebenfalls über
- 25 werden.

- Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zunächst eine Lösung des Wirkstoffes in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt, wobei Lösung in diesem Zusammenhang eine echte mole-
- 30 kulardisperse Lösung oder eine Schmelzemulsion bedeutet. Dabei können je nach Wirkstoff Temperaturen von 0 -250 °C und Drücke bis 100 bar eingesetzt werden. Als Lösungsmittel geeignet sind organische, mit Wasser mischbare Lösungsmittel, welche flüchtig und thermisch stabil sind und nur Kohlenstoff, Wasserstoff,
- 35 Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel enthalten. Zweckmäßigerweise sind sie zu mindestens 10 Gew.-% mit Wasser mischbar und weisen einen Siedepunkt unter 200 °C auf und/oder haben weniger als 10 Kohlenstoffatome. Bevorzugt sind entsprechende Alkohole, Ester, Ketone, Ether und Acetale. Insbesondere verwendet man man
- 40 Ethanol, n-Propanol, Isopropanol, Butylacetat, Ethylacetat, Tetrahydrofuran, Aceton, 1,2-Propandiol-1-n-propylether oder 1,2-Butandiol-1methylether. Ganz besonders bevorzugt sind Ethanol, Isopropanol und Aceton.
- 45 Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens wird eine molekular-disperse Lösung des Wirkstoffes in dem gewählten Lösungsmittel zusammen mit dem Polymer, daß in der Wirkstoff-Zubereitung im

Kern der Partikel liegen soll, hergestellt. Dieses Polymer hat die Eigenschaft, in einem bestimmten Temperatur-, pH- oder Salz-Bereich nicht oder nur teilweise in Wasser löslich zu sein.

- 5 Die Konzentration der so hergestellten Wirkstoff-Polymer-Lösung beträgt im allgemeinen 10 bis 500 g Wirkstoff pro 1 kg Lösungsmittel und 0,01 bis 400 g Polymer, wobei das Polymer-Wirkstoff-Gewichtsverhältnis zwischen 0.01 zu 1 und 5 zu 1 liegt. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird der nieder-
- 10 molekulare Stabilisator direkt zu der Wirkstoff-Polymer-Lösung gegeben.

- In einem sich daran anschließenden Verfahrensschritt wird die Wirkstoff-Polymer-lösung mit einer wässrigen Lösung des polymeren
- 15 Hüllmaterials vermischt. Die Konzentration des polymeren Hüllmaterials beträgt 0.1 bis 200 g/l, vorzugsweise 1 bis 100 g/l.

- Gemäß einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens wird eine molekulardisperse Lösung des Wirkstoffes in dem gewählten
- 20 Lösungsmittel ohne dem Polymer, daß in der Wirkstoff-Zubereitung im Kern der Partikel liegen soll, hergestellt. Die Konzentration der so hergestellten Wirkstoff-Lösung beträgt im allgemeinen 10 bis 500 g Wirkstoff pro 1 kg Lösungsmittel.
- 25 In einem sich daran anschließendem Verfahrensschritt wird diese Lösung mit einer wässrigen molekularen Lösung des Polymers gemischt, daß in der Wirkstoff-Zubereitung im Kern der Partikel liegen soll. Die Konzentration der so hergestellten Polymer-Lösung beträgt im allgemeinen 0,01 bis 400 g Polymer. Dabei wer-
- 30 den die Temperaturen, pH-Werte und Salzkonzentrationen der beiden zu vereinigenden Lösungen so gewählt, daß nach der Vereinigung der Lösungen der Wirkstoff und das Polymer unlöslich sind. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird der nieder-molekulare Stabilisator direkt zu der Wirkstoff-Lösung gegeben.
- 35 In einem sich daran anschließenden Verfahrensschritt wird das Wirkstoff-Polymer-Präzipitat mit einer wässrigen Lösung des polymeren Hüllmaterials vermischt. Die Konzentration des polymeren Hüllmaterials beträgt 0.1 bis 200 g/l, vorzugsweise 1 bis 100
- 40 g/l.

- Um beim Mischvorgang möglichst kleine Teilchengrößen zu erzielen, empfiehlt sich ein hoher mechanischer Energieeintrag beim Vermischen der Cyclosporin-Lösung mit der Lösung des Hüllmaterials.
- 45 Ein solcher Energieeintrag kann beispielsweise durch starkes Rühren oder Schütteln in einer geeigneten Vorrichtung erfolgen, oder dadurch, daß man die beiden Komponenten mit hartem Strahl in

eine Mischkammer einspritzt, sodaß es zu einer heftigen Vermischung kommt.

Der Mischvorgang kann diskontinuierlich oder, bevorzugt, kontinuierlich erfolgen. Als Folge des Mischvorgangs kommt es zu einer Präzipitation. Die so erhaltene Suspension bzw. das Kolloid kann dann auf an sich bekannte Weise in ein Trockenpulver überführt werden, beispielsweise durch Sprühtrocknung, Gefriertrocknung oder Trocknung im Wirbelbett.

10

Welche Bedingungen bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens hinsichtlich Variation des Systems Wasser/organisches Lösungsmittel, der pH-Werte, der Temperaturen oder der Ionenstärken im konkreten Fall zu wählen sind, kann der Fachmann mit Hilfe des 2. Virialkoeffizienten durch einige einfache Vorversuche für das entsprechende Polymer ermitteln.

Im folgenden kann die Primärdispersion dem Fachmann bekannten Trocknungsprozessen unterzogen werden.

20

Demzufolge lassen sich die erfindungsgemäßen nanopartikulären Systeme nach der Herstellung auch Trocknen z.B. durch Sprühtrocknung oder Lyophilisation und anschließend mit nahezu der gleichen Teilchengrößenverteilung wieder redispersieren. Dies ist für alle Anwendungen von großem Vorteil bei denen die Zubereitung möglicherweise lange gelagert werden muß, extremen Belastungen wie Hitze oder Kälte ausgesetzt ist oder von einem wäßrigen Träger in andere Träger als Lösungsmittel überführt werden soll. Damit sind die erfindungsgemäßen Zubereitungen auch nicht mehr an das Lösungsmittel gebunden mit dem sie hergestellt wurden. Bei der Lyophilisation der erfindungsgemäßen Nanopartikel können kryoprotektive Substanzen wie z.B. Trehalose oder Polyvinylpyrrolidone zugesetzt werden.

Erfindungsgemäß lassen sich damit Trockenpulver erhalten, die ihre in der Primärdispersion gewonnen Eigenschaften nicht mehr verlieren. Das heißt amorpher Charakter des Wirkstoffes und Kern-Schale Struktur bleiben erhalten. Es ist weiterhin eine erfindungsgemäße Eigenschaft, das diese Dispersionen beim erneuten Auflösen mit einer Abweichung von 20% bevorzugt < 15% die gleiche Partikelgrößenverteilung zeigen, die sie als Primärdispersion besaßen.

Die Grenzflächenspannung der erfindungsgemäßen nanopartikulären

Dispersionen beträgt zwischen 20 - 40 mN/m, bevorzugt 10 - 30 nN/m.

10

Die Teilchengrößen der Kern-Schale-Strukturen liegen im Bereich von 0,1 bis 2 µm, bevorzugt 0,05 bis 0,9 µm.

Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäß schwerlösliche Wirkstoffe mit einer Löslichkeit von kleiner 10 mg /ml Wasser bei 25°C.

Geeignete Wirkstoffe sind beispielsweise:

- 10 - Analgetika/Antirheumatika wie Codein, Diclofenac, Fentanyl, Hydromorphon, Ibuprofen, Indomethacin, Levomethadon, Morphin, Naproxen, Pritramid, Piroxicam, Tramadol
- Antiallergika wie Astemizol, Dimetinden, Doxylamin, Loratadin, Meclozin, Pheniramin, Terfenadin
- 15 - Antibiotika/Chemotherapeutica wie Erythromycin, Framycetin, Fusidinsäure, Rifampicin, Tetracyclin, Thiazetazon, Tyrothricin
- 20 - Antiepileptika wie Carbamazepim, Clonazepam, Mesuximid, Phenytoin, Valproinsäure
- Antimykotika wie Clotrimazol, Fluconazol, Itraconazol
- 25 - Calcium-Antagonisten wie Darodipin, Isradipin
- Corticoide wie Aldosteron, Betametason, Budesonid, Dexametason, Fluocortolon, Fludrocortison, Hydroxycortison, Methylprednisolon, Prednisolon
- 30 - Hypnotika/Sedativa
Benodiazepine, Cyclobarbitol, Methaqualon, Phenobarbital
- 35 - Immunsuppressiva
Azathioprin, Cyclosporin
- Lokalanaesthetika
Benzocain, Butanilacain, Etidocain, Lidocain, Oxybuprocain, Tetracain
- 40 - Migränemittel
Dihydroergotamin, Ergotamin, Lisurid, Methysergid

45

11

- Narkotika
Droperidol, Etomidat, Fentanyl, Ketamin, Methohexital, Propofol, Thiopental
- 5 - Ophthalmika
Acetazolamid, Betaxolol, Bupranolol, Carbachol, Carteolol, Cycloclonol, Cyclopentolat, Diclofenamid, Edoxodin, Homatropin, Levobunolol, Pholedrin, Pindolol, Timolol, Tropicamid
- 10 - Phytopharmaka
Hypericum, Urtica folia, Artischoke, Agnus Castus, Cimicifuga, Teufelskrallen, Besenginster, Pfefferminzöl, Eukalyptus, Schöllkraut, Efeu, Kava-Kava, Echinacea, Baldrian, Sabalextrakt, Hypericum, Mariendistel, Ginkgo Biloba, Aloe barbadensis, Allium sativum, Panax Ginseng, Serenoa Repens, Hydrastis canadensis, Vaccinium macrocarpon oder Mischungen daraus
- Proteasehemmer
z. B. Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Zalcitabine oder Kombinationen aus diesen Proteaseinhibitoren
- 20 - Sexualhormone und ihre Antagonisten
Anabolika, androgene, Antiandrogene, Estradiole, Gestagene, Progesteron, Oestrogene, Antioestrogene wie Tamoxifen
- 25 - Vitamine/Antioxidantien wie Carotinoide oder Carotinoid-Analoga, z.B. β -Carotin, Canthaxanthin, Astaxanthin, Lycopin oder Liponsäure
- 30 - Zytostatika/Antimetastatica
Busulfan, Carmustin, Chlorambucil, Cyclophosphamid, Dacarbacin, Dactinomycin, Estramustin, Etoposid, Flurouracil, Ifosfamid, Methotrexat, Paclitaxel, Vinblastin, Vincristin, Vinorelbine
- 35 Die erfindungsgemäßen nanopartikulären Zubereitungen eignen sich prinzipiell zur Herstellung aller pharmazeutischer Darreichungsformen: orale Arzneiformen, topische Arzneiformen wie Dermatica, Ophthalmica, pulmonale oder nasale Formen, buccale Formen, anale oder intravaginale Formen, enterale und parenterale Formen.
- 40 So lassen sich die erfindungsgemäßen Zubereitungen zu Tabletten, Pellets, Sachets, Trinkformulierungen, Suppositorien, Injektionslösungen oder als Kapselfüllungen verarbeiten.

12

So ist z. B. die Formulierung in Weich- oder Hartgelatine-Zubereitungen. Solche Formulierungen stellen dann Beispiele multipartikulärer Systeme dar, in denen die Nanopartikel die eine Phase die Zubereitung der Weichgelatine Matrix eine andere Phase ist, die zudem wieder einen anderen oder den gleichen Wirkstoff enthalten kann.

Im gleichen Sinne könne die erfindungsgemäßen Systeme auch in andere Matrices eingebracht werden und dabei eine getrennte Phase von der Restlichen Matrix darstellen. Solche Matrices können Tabletten, Zäpfchen oder Systeme zur pulmonalen Applikation oder transdermalen Applikation sein.

Im Zusammenhang mit amorpher Wirkstoffeinbettung ist auch eine besondere Eigenschaft von Wirkstoffen, die Polymorphie, zu nennen. Viele Wirkstoffe existieren in mehr als einer kristallinen Form. Generell kann angenommen werden, daß mehr als 50 % aller Wirkstoffe in mehreren kristallinen Formen existieren. Alle diese polymorphen Modifikationen eines Wirkstoffes sind chemisch identisch, besitzen aber unterschiedliche physikalische Eigenschaften wie Schmelzpunkt, Dichte und Löslichkeit. Damit nehmen die unterschiedlichen Modifikationen auch Einfluß auf die Verarbeitbarkeit und im kritischsten Fall auch auf die Bioverfügbarkeit.

Die erfindungsgemäßen Zubereitungen ermöglichen es in einfacher Weise, Wirkstoffe in den amorphen Zustand zu überführen und kann als Einsatzstoffe auch Produkte unterschiedlichster Korngrößenverteilung als auch amorphe Bulk-Materialien verwenden und somit das Problem verschiedener Polymorpher Formen und damit verbundener möglicher Nachteile mit Hinblick auf Löslichkeit, Lagerstabilität und Bioverfügbarkeit umgehen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es auch, für die nanopartikulären amorphen Kern-Schale Strukturen neue Zubereitungsformen zu finden. Überraschenderweise gelang es, nach Anpassung der eingesetzten polymeren Stabilisatoren gemäß den Anforderungen an Injektibila stabile Kern-Schale Strukturen auch mit Gelatine-Hydrolisaten zu erreichen. Vorteilhaft an der Verwendung solcher Gelatine Hydrolisate ist die deutlich geringere Histaminantwort in vivo bei Applikation als intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Verabreichung.

Die erfindungsgemäßen Nanopartikel ermöglichen eine aseptische Herstellung und Steril-Filtration.

13

Da feste Tumore die Fähigkeit besitzen, Partikel aus dem Blutstrom zu filtern, sind die erfindungsgemäßen Zubereitungen geeignet, ein Tumortargetting zu erreichen. Es können so lokal hochkonzentrierte Anreicherungen cytotoxischer Substanzen erzielt werden.

- 5 Damit ist die Therapie von Krebserkrankungen durch die erfindungsgemäßen nanopartikulären Systeme besonders bevorzugt.

Cytostatika die sich bevorzugt für die erfindungsgemäße Technologie eignen sind Taxole wie Paclitaxel, cis-Platin aber auch

- 10 nicht interkalierende Farnesyltransferaseinhibitoren.

Weiterhin ist es bekannt, daß nanopartikuläre Systeme die Blut-Hirn Schranke überwinden können und damit insbesondere im Bereich der Therapie von ZNS-Erkrankungen eingesetzt werden können.

- 15 Gleiches gilt auch für die erfindungsgemäßen Nanopartikel die sich damit insbesondere auch für den Einsatz zur Behandlungen von Erkrankungen im Gebiet der ZNS eignen.

Obwohl die das Polymergewicht deutlich niedriger ist als bei in

- 20 EP-A 425 892 beschriebenen Formen, gelingt es den Anforderungen angepaßte stabile Produkte zu erhalten. Vorteilhaft ist die geringe Anzahl von Hilfsstoffen im Vergleich zu anderen Verfahren. Die erfindungsgemäßen Zubereitungen der amorphen Kern-Schale Nanopartikel bestehen oftmals lediglich aus dem polymeren Träger
25 und der biologisch aktiven Substanz.

Die erfindungsgemäßen amorphen Kern-Schale Nanopartikel besitzen aufgrund des Verfahrens einen weiteren Vorteil. Durch die intensive Vermischung der biologisch aktiven Substanz aus einem

- 30 Lösungsmittel in ein Nicht-Lösungsmittel gelingt es geringe Anteile des Polymeren das später durch Adsorption an der Oberfläche aggregiert, während der Ausbildung der sphärischen Struktur in die Matrix einzubringen. Dies trägt zur Stabilisierung des amorphen und damit metastabilen Zustandes bei. Konkret handelt es
35 sich als um ein Mehrphasen-System mit einer äußeren Schale aus dem für die Dispergierung verantwortlichen polymeren Zusatz und einer amorphen Struktur, die weiterhin gelöst den gleichen polymeren oder einen anderen Zusatz als Kristallisationsinhibitor enthält.

- 40 Eine besondere Situation ist das Auftreten flüssig kristalliner Systeme in der amorphen Phase der erfindungsgemäßen Zubereitungen.

Zubereitungen niedermolekularer Peptide wie z.B. dem LMWH ermöglicht die Applikation auf oralem Wege sowie vorteilhafterweise mit einer gleichen Formulierung als Injektion, dem derzeit standardmäßig eingesetzten Applikationsweg bei Deep vein thrombosis.

5

Generell kann festgehalten werden, daß die erfindungsgemäßen Zubereitungen vorteilhafterweise in nahezu allen Applikationsformen auf Basis nur einer einzigen Formulierung eingesetzt werden können.

10

Die erfindungsgemäßen Zubereitungen eignen sich auch für das Colon-Targetting.

Erfindungsgemäß ist es ebenfalls möglich, injezierbarer Depot-

15 Präparate zu erhalten.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Präparationen in der parenteralen Ernährung einsetzen. Dabei läßt sich die erfindungsgemäße Präparation insbesondere zur Formulierung von Vitaminen

20 und Aminosäuren verwenden.

In der Nikotin-Ersatztherapie können mit den erfindungsgemäßen Zubereitungen z.B. mit Nicotin-Tartrat oder Nicotin-Base die notwendigen Plasmaspitzen erreicht werden, denen im Ent-

25 wöhnungsprozess besondere Bedeutung zukommt.

Auch die topikale Anwendung für Haar-Wachstums-Wirkstoffe wie Minoxidil ist mit der erfindungsgemäßen Zubereitung vorteilhaft. Aufgrund der Struktur können die Haarfollikel besser erreicht

30 werden.

In der pulmonalen Applikation der erfindungsgemäßen Präparationen ist neben der Verabreichung von Asthmatherapeutika wie Budesonid und cytostatika insbesondere an die Verabreichung von Protein-

35 und Peptidtherapeutika gedacht. Beispiele sind Vasopressin analog, LHRH-Antagonisten, Glukagon, Parathyroides Hormon, Calcitonin, Insulin, LHRH-Analog Leuprolipide, Granulocyte-colony stimulating factor und Somatropin.

40 Die Applikation kann neben der Verabreichung als Pulver auch als zerstäubte wässrige Suspension erfolgen. Die Applikation kann über Nase, Bronchien bzw. Lunge erfolgen. Es ist bei nasaler Applikation insbesondere vorteilhaft eine wässrige Suspension zu wählen, da so eine Reizung der Nasenschleimhäute und das Empfin-

45 den eines Brennens durch organische Lösungsmittel vermieden wird.

15

Insbesondere die Wirkstoffklasse der Leukotrienantagonisten eignet sich als Einsatzgebiet für die Technologie.

Die erfindungsgemäßen Zubereitungen könne auch genutzt werden, um

- 5 Antisense-Wirkstoffe also Oligonukleotide mit komplementärer Basensequenz zu Boten-RNA in applizierbare Formulierungen zu bringen. Bevorzugt sind Phosphorothioate Oligonukleotide. Dabei kann neben lokaler Injektion auch an subkutaner oder intravenöse Applikation als Infusion oder Injektion auch die orale Applika-
10 tion genutzt werden. Weiter ist aber auch die dermale Applikation und die Inhalation denkbar.

In oralen Formen die sowohl aus Zubereitungen in herkömmlichen Tabletten, als auch in Kapseln Verwendung finden können lassen

- 15 sich die erfindungsgemäßen Formen einsetzen. Insbesondere die Möglichkeit auch Zäpfchen Formulierungen herstellen zu können, was durch die Stabilität der erfindungsgemäßen Nanopartikel beim Einrühren in die Trägermatrizes gewährleistet wird, eröffnet dieses Anwendungsfeld. Vorteilhaft ist hier das bei rektaler
20 Verabreichung nur ein begrenztes Flüssigkeitsvolumen zur Verfügung steht und die erfindungsgemäßen Zubereitungen außerordentlich gut in dem kleinen Flüssigkeitsvolumen dispergieren und resorbiert werden können.

- 25 Allgemein kann die Vorteilhaftigkeit der erfindungsgemäßen Formen in den Punkten:

- größere relative Bioverfügbarkeit
- geringer Food-Effekt
- 30 • geringere Variabilität

festgehalten werden.

Da als Schalepolymeren auch Acrylate, Lektine, Kaseinate,

- 35 Gelatinen, Chitosane, Hyaluronsäuren oder Muscheladhäsionsprotein verwendet werden kann, können auch mukoadhäsive Präparationen mit nanopartikulärer Größe hergestellt werden.

Das erhöhte Haftvermögen von nanopartikulären Zubereitungen kann
40 letztendlich auch zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit führen. Dies kann insbesondere bei nasaler Applikation von Interesse sein.

- Hinzu kommt, daß das Haftvermögen der nanopartikulären Teilchen an der Mucosa der Nasenschleimhaut einen positiven Effekt auf die sonst eher zu kurze Verweildauer hat, und so zur Erhöhung der
45 Bioverfügbarkeit beitragen kann.

Auch am Auge sind die erfindungsgemäßen Zubereitungen einsetzbar. Insbesondere in Gel-Systemen, die durch Viskositätserhöhung bei Körpertemperatur reagieren, bilden die erfindungsgemäßen nanopartikulären Systeme eine separate Phase, die den Wirkstoff in

- 5 nanopartikulärer amorpher Form dem Auge zu führen kann und sich homogen während der Gelbildung in der Matrix verteilt.

Ebenso sind Kontrastmittel für die bildgebende medizinische Diagnostik wie Röntgenverfahren, Szintigraphie, Ultraschall, Magne-

- 10 toresonanztomographie, Fluoreszenzangiographie und Ophthalmologie mit den erfindungsgemäßen Zubereitungen herstellbar.

In Kosmetika und Dermatika können die erfindungsgemäßen nanopartikulären Kern-Schale Nanopartikel zum Schutz von hydrolyse-

- 15 empfindlichen Wirkstoffen eingesetzt werden. Weiterhin sind solche Zubereitungen in der Lage, aufgrund der geringen Partikelgröße die Penetration zwischen die Stratum Corneum Zellen zu erleichtern. Im Bereich der Kosmetik können die erfindungsgemäßen Zubereitungen Anwendung in der Formulierung von Parfüms sowie dekorativen Kosmetik finden, wie z.B. der Einbringung von Farbstoffen oder Pigmenten in Lippenstifte, Eyeliner, Lidschatten oder Nagellacke. Auch in Cremes, Gelen und Salben sind die Präparationen einsetzbar.

- 25 Besonders vorteilhaft an den erfindungsgemäßen nanopartikulären Zubereitungen ist, daß nur wenige Hilfsstoffe benötigt werden. Abgesehen von der polymeren Hüllmatrix und den Matrixpolymeren im Kern kann auf weitere oberflächenaktive Hilfsstoffe weitgehend verzichtet werden.

30

Herstellbeispiel 1

Herstellung eines Ritonavir Trockenpulvers mit einem Wirkstoffgehalt im Bereich von 20 Gew.-%

35

a) Herstellung des Mikronisates

- 3 g Ritonavir wurden in eine Lösung von 0,6 g Ascorbylpalmitat und 0.6 g eines Copolymers aus Ethylacrylat und Methacrylsäure (1:1), (Kollicoat[®] MAE, BASF AG) in 36 g Isopropanol bei 25°C
- 40 eingerührt, wobei eine trübe grobdisperse Suspension entstand.

- Zur Überführung des Ritonavirs und des Kollicoats in eine molekulardisperse Form wurde diese grobdisperse Lösung mit 120 g Wasser bei einer Mischungstemperatur von 200 °C für 0.3 s gemischt. Zur
- 45 Ausfällung des Ritonavirs und des Kollicoats in kolloiddisperser Form wurde diese molekulardisperse Lösung einer weiteren Misch-

kammer zugeführt. Dort erfolgte die Vermischung mit 490 g einer mittels 1 N NaOH auf pH = 9,0 eingestellten wäßrigen Lösung von 4.3 g Gelatine A 100 und 6,5 g Lactose in vollentsalztem Wasser bei 25 °C. Der gesamte Prozeß erfolgte unter Druckbegrenzung auf 30 bar. Nach dem Mischen wurde eine kolloiddisperse Ritonavir-Dispersion mit einem gelblich-trüben Farbton erhalten.

Durch quasielastische Lichtstreuung wurde die mittlere Teilchengröße zu 260 nm bei einer Varianz von 42 % bestimmt. Die mittlere Teilchengröße vergrößerte sich innerhalb einer Stunde um nur 20 nm auf 280 nm. Eine analog hergestellte kolloidale Ritonavir-Dispersion ohne Kollicoat zeigt innerhalb einer Stunde eine Zunahme der Teilchengröße um 400 nm. Dieser Sachverhalt ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Zeit nach Herstellung der kolloidalen Dispersion	Kolloidale Dispersion mit Kollicoat	Kolloidale Dispersion ohne Kollicoat
3 min	260 nm	410 nm
15 min	259 nm	485 nm
30 min	258 nm	671 nm
60 min	281 nm	835 nm

b) Trocknung der Dispersion a) zu einem nanopartikulärem Trockenpulver

Sprühtrocknung des Produktes 1a) ergab ein nanopartikuläres Trockenpulver. Der Wirkstoffgehalt im Pulver wurde chromatographisch zu 19.84 Gew.-% bestimmt. Das Trockenpulver löst sich in Trinkwasser unter Ausbildung einer gelblich-trüben Dispersion (Hydrosol) mit einer mittleren Teilchengröße von 306 nm bei einer Varianz von 48 %. Die mittlere Teilchengröße vergrößerte sich innerhalb einer Stunde um nur ca. 30 nm auf 349 nm. Eine analog hergestellte kolloidale Ritonavir-Dispersion ohne Kollicoat zeigt innerhalb einer Stunde eine Zunahme der Teilchengröße um ca. 350 nm. Dieser Sachverhalt ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

5	Zeit nach Herstellung der kolloidalen Dispersion	Kolloidale Dispersion mit Kollicoat	Kolloidale Dispersion ohne Kollicoat
	3 min	306 nm	585 nm
	15 min	307 nm	726 nm
	30 min	324 nm	815 nm
10	60 min	349 nm	938 nm

c) Röntgenweitwinkelstreuung

In Figur 1 sind die Streukurven von Wirkstoff (oben) und Trockenpulver gemäß 1b) (unten) abgebildet. Das Ritonavir Ausgangsmaterial ist, wie das durch eine Reihe scharfer Interferenzen ausgezeichnete Röntgendiagramm belegt, kristallin. Im Gegensatz dazu weist die Streukurve des Trockenpulvers nur diffuse, breite Interferenzmaxima auf, wie sie für ein amorphes Material typisch sind. Der Wirkstoff liegt im nach 1b) hergestellten Trockenpulver demnach röntgenamorph vor. Dies gilt auch für die sonst kristallinen Hilfsstoffe Lactose und Ascorbylpalmitat

Herstellbeispiel 2

25 Herstellung eines Cyclosporin Trockenpulvers mit einem Wirkstoffgehalt im Bereich von 20 Gew.-%

a) Herstellung des Mikronisates

30 3 g Cyclosporin wurden in eine Lösung von 0,6 g Ascorbylpalmitat und 0,6 g Kollicoat[®] MAE (BASF AG) in 36 g Isopropanol bei 25 °C eingerührt, wobei eine leicht trübe Suspension entstand.

Zur Überführung des Cyclosporin A und des Kollicoats in eine molekulardisperse Form wurde diese grobdisperse Lösung mit 120 g Wasser bei einer Mischungstemperatur von 200 °C für 0,3 s gemischt. Zur Ausfällung des Cyclosporin und des Kollicoats in kolloiddisperser Form wurde diese molekulardisperse Lösung einer weiteren Mischkammer zugeführt. Dort erfolgte die Vermischung mit 40 490 g einer mittels 1 N NaOH auf pH = 9,0 eingestellten wäßrigen Lösung von 4,3 g Gelatine A 100 und 6,5 g Lactose in vollentsalztem Wasser bei 25 °C. Der gesamte Prozeß erfolgte unter Druckbegrenzung auf 30 bar. Nach dem Mischen wurde eine kolloiddisperse Cyclosporin A-Dispersion mit einem weiß-trüben Farbton 45 erhalten.

Durch quasielastische Lichtstreuung wurde die mittlere Teilchengröße zu 249 nm bei einer Varianz von 42 % bestimmt. Die mittlere Teilchengröße vergrößerte sich innerhalb einer Stunde im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht. Eine analog hergestellte kolloidale Cyclosporin-Dispersion ohne Kollicoat zeigt innerhalb einer Stunde eine Zunahme der Teilchengröße um 250 nm. Dieser Sachverhalt ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3

10

	Zeit nach Herstellung der kolloidalen Dispersion	Kolloidale Dispersion mit Kollicoat	Kolloidale Dispersion ohne Kollicoat
15	3 min	249 nm	330 nm
	15 min	257 nm	364 nm
	30 min	251 nm	410 nm
	60 min	248 nm	580 nm

b) Trocknung der Dispersion a) zu einem nanopartikulärem Trockenpulver

20

Sprühtrocknung des Produktes 2a) ergab ein nanopartikuläres Trockenpulver. Der Wirkstoffgehalt im Pulver wurde chromatographisch zu 20.03 Gew.-% bestimmt. Das Trockenpulver löst sich in Trinkwasser unter Ausbildung einer weiß-trüben Dispersion (Hydrosol) mit einer mittleren Teilchengröße von 263 nm bei einer Varianz von 48 %. Die mittlere Teilchengröße vergrößerte sich innerhalb einer Stunde im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht. Eine analog hergestellte kolloidale Cyclosporin-Dispersion ohne Kollicoat zeigt innerhalb einer Stunde eine Zunahme der Teilchengröße um ca.150 nm. Dieser Sachverhalt ist in Tabelle 4 zusammengestellt.

25

30

Tabelle 4

35

	Zeit nach Herstellung der kolloidalen Dispersion	Kolloidale Dispersion mit Kollicoat	Kolloidale Dispersion ohne Kollicoat
40	3 min	263 nm	435 nm
	15 min	259 nm	463 nm
	30 min	264 nm	518 nm
	60 min	267 nm	575 nm

45

Herstellbeispiel 3

Analog zu Beispiel 1 wurde ein Mikronisat, welches Propafenon als Wirkstoff enthielt, hergestellt.

5

Herstellbeispiel 4

Analog zu Beispiel 2 wurde ein Mikronisat, welches anstelle des Polymers Kolliciat® MAE als Polymer ein Poly(D,L-lactid-co-glycolid) (49 mol-% D,L-Lactid, 51 mol-% Glycolid) enthielt, hergestellt.

Herstellbeispiel 5

Herstellung eines Canthaxanthin Trockenpulvers mit einem Wirkstoffgehalt im Bereich von 5 Gew.-%

a) Herstellung des Mikronisates

15 g Canthaxanthin wurden in eine Lösung von 6 g Ethoxiquin und 45 g Kollicoat MAE in 400 g Tetrahydrofuran bei 25°C eingerührt, wobei eine trübe grobdisperse Suspension entstand.

Zur Überführung des Canthaxanthins in eine molekulardisperse Form wurde diese grobdisperse Lösung mit einem Massenfluß von 1,8 kg/h durch einen Wärmetauscher gepumpt und dabei auf eine Temperatur von 161,5°C erhitzt. Zur Ausfällung des Canthaxanthins und des Kollicoats in kolloiddisperser Form wurde diese molekulardisperse Lösung 1,4 sec. nach Erreichen der Temperatur von 161,5°C einer weiteren Mischkammer zugeführt. Dort erfolgte die Vermischung mit 9600 g einer mittels 1 N NaOH auf pH = 11,8 eingestellten wäßrigen Lösung von 30 g Gelatine B 200 und 25 g Saccharose in vollentsalztem Wasser bei 25°C. Der gesamte Prozeß erfolgte unter Druckbegrenzung auf 60 bar. Nach dem Mischen wurde eine kolloiddisperse Canthaxanthin-Dispersion mit einem rot-trüben Farbton erhalten.

Durch quasielastische Lichtstreuung wurde die mittlere Teilchengröße zu 796 nm bei einer Varianz von 81 % bestimmt.

b) Trocknung der Dispersion a) zu einem nanopartikulärem Trockenpulver

Aufarbeitung am Rotationsverdampfer und anschließende Sprühtrocknung des Produktes 1a) ergab ein nanopartikuläres Trockenpulver. Der Wirkstoffgehalt im Pulver wurde UV/VIS-spektroskopisch zu 5,75 Gew.-% bestimmt. Das Trockenpulver löst sich in Wasser bei pH-Werten > 7 unter Ausbildung einer rot-trüben Dis-

21

persion (Hydrosol) mit einer mittleren Teilchengröße von 722 nm bei einer Varianz von 43 %.

Herstellbeispiel 6

5

Herstellung eines Astaxanthin Trockenpulvers mit einem Wirkstoffgehalt im Bereich von 25 Gew.-%

a) Herstellung des Mikronisates

10

1 g Astaxanthin wurden in eine Lösung von 3 g eines Copolymers aus Methacrylsäure/Methylmethacrylat im Verhältnis 1:1 (Eudragit L 100, Röhm GmbH) in 200 g Tetrahydrofuran bei 25°C eingerührt. Zur Überführung des Astaxanthins in eine molekulardisperse Form

15 wurde diese disperse Lösung mit einem Massenfluß von 1,8 kg/h durch einen Wärmetauscher gepumpt und dabei auf eine Temperatur von 73°C erhitzt. Zur Ausfällung des Astaxanthins und des Eudragit L 100 in kolloiddisperser Form wurde diese molekulardisperse Lösung einer weiteren Mischkammer zugeführt. Dort erfolgte die

20 Vermischung mit 10 000 g vollentsalztem Wasser bei 25°C. Der gesamte Prozeß erfolgte unter Druckbegrenzung auf 30 bar. Nach dem Mischen wurde eine kolloiddisperse Astaxanthin-Dispersion mit einem roten Farbton erhalten.

25 Durch quasielastische Lichtstreuung wurde die mittlere Teilchengröße zu 256 nm bei einer Varianz von 56 % bestimmt.

b) Trocknung der Dispersion a) zu einem nanopartikulärem Trockenpulver

30

Aufarbeitung am Rotationsverdampfer und anschließende Sprühtrocknung des Produktes 1a) ergab ein nanopartikuläres Trockenpulver. Der Wirkstoffgehalt im Pulver wurde UV/VIS-spektroskopisch zu 24,3 Gew.-% bestimmt. Das Trockenpulver löst sich in al-

35 kalischem Wasser unter Ausbildung einer roten Dispersion (Hydrosol) mit einer mittleren Teilchengröße von 273 nm bei einer Varianz von 53 %.

40

45

Herstellbeispiel 7

Herstellung eines Astaxanthin Trockenpulvers mit einem Wirkstoffgehalt im Bereich von 25 Gew.-%

5

a) Herstellung des Mikronisates

- 2 g Astaxanthin wurden in eine Lösung von 6 g Eudragit L 100 (Röhm GmbH) in 200 g Tetrahydrofuran bei 25°C eingerührt. Zur
- 10 Überführung des Astaxanthins in eine molekulardisperse Form wurde diese disperse Lösung mit einem Massenfluß von 2,0 kg/h durch einen Wärmetauscher gepumpt und dabei auf eine Temperatur von 73°C erhitzt. Zur Ausfällung des Astaxanthins und des Eudragit L 100 in kolloiddisperser Form wurde diese molekulardisperse Lösung
- 15 einer weiteren Mischkammer zugeführt. Dort erfolgte die Vermischung mit 10 000 g vollentsalztem Wasser bei 25°C. Der gesamte Prozeß erfolgte unter Druckbegrenzung auf 30 bar. Nach dem Mischen wurde eine kolloiddisperse Astaxanthin-Dispersion mit einem roten Farbton erhalten.

20

Durch quasielastische Lichtstreuung wurde die mittlere Teilchengröße zu 178 nm bei einer Varianz von 22 % bestimmt.

- b) Trocknung der Dispersion a) zu einem nanopartikulärem
- 25 Trockenpulver

- Aufarbeitung am Rotationsverdampfer und anschließende Sprühtrocknung des Produktes 1a) ergab ein nanopartikuläres Trockenpulver. Der Wirkstoffgehalt im Pulver wurde UV/VIS-spektroskopisch zu 22,7 Gew.-% bestimmt. Das Trockenpulver löst sich in alkalischem Wasser unter Ausbildung einer rot-trüben Dispersion (Hydrosol) mit einer mittleren Teilchengröße von 175 nm bei einer Varianz von 25 %.
- 30

- 35 Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nanopartikel können beispielsweise folgende Darreichungsformen hergestellt werden:

1. Tablette

- 40 10 Gew. % der nanoteiligen (geträgert auf Laktose) Zubereitung werden mit 10 Gew% Saccharose 28 Gew. % mikrokristalliner Cellulose, 3 Gew. % Kollidon VA 64 sowie 0,2 Gew. % Aerosil gemischt und anschließend direkt verpreßt. Das Tablettengewicht beträgt 250 mg. Der Durchmesser beträgt 8 mm. Die Härte 150 N, der
- 45 Zerfall in Wasser 13 min.

2. Patch

Ein Patch mit einem Reservoir aus 17.5 Gew. % Polystyrol und 17.5 Gew. % Polyvinylacetat und 30 Gew% der erfindungsgemäßen Nanopartikel wurde hergestellt.

3. Öl in Wasser Creme

24 g Paraffinöl, 5 g Cremophor S 9 (Polyethylenglykolstearat), 6 g Bienenwachs, 2 g Cutina CP (Cetyl Palmitat) 3 g Glycerin und 60 g Wasser bilden die Basis für die Creme in die 20 g der erfindungsgemäßen nanoteiligen Zubereitung eingerührt werden.

Zu Anfertigung wird Cremophor in der Fettphase gelöst und diese Mischung mit Wasser unter heftigem Rühren versetzt. Es wird bis zum Erkalten gerührt und dann die nanoteilige Zubereitung zugegeben und homogenisiert.

4. Formulierung zur topischen Anwendung

Eine Zubereitung zur topischen Anwendung mit den nanopartikulären kern-schale Zubereitungen wurde wie folgt erhalten: (in g/100g)

0,14 g Methylparaben und 0,1 g Propylparaben sowie 0,1 g EDTA-Dihydrat werden in 78,42 g Wasser bei 80°C gelöst. Man läßt auf ca. 30 °C abkühlen und gibt dann 20 g der erfindungsgemäßen Nanopartikel als Pulver zu und homogenisiert durch Rühren. Anschließend werden 0,8 g Carbomer 934 P und 0,44 g NaOH zugegeben.

5. Gel

Propylenglykol 20 g, Poloxamer 188 5 g, Poloxamer 407 22 g, NaCl 1 g, Wasser 51 g, Mikronisat gemäß Beispiel 1 20 g.

6. Augentropfen

10 g Mikronisat gemäß Beispiel 1, 14 g Kollidon K 25, Konservierungsmittel q.s., Wasser ad 100 g.

7. Aerosol

Zubereitung einer Pulverformulierung aus:
einer Nanopartikelformulierung mit 75 mg Budesonid zu deren wäßriger kolloidaler Suspension 1400 g Laktose gegeben werden. Anschließend wird die Mischung sprühgetrocknet. Die Partikelgröße des erhaltenen Pulvers liegt bei 7 µm, der Feuchtegehalt bei 0,8 Gew. %.

Zubereitung mit Treibmittel:

- 0,25 Gew. % einer nanoteiligen Budesonid Zubereitung werden mit einer Mischung von 4 Gew. % aus Ethnaol und Wasser (50:50) und
5 95,75 Gew. % 1,1,1,2 Tetrafluorethan in einem Aluminium Gefäß unter Druck abgefüllt.

8. Pflaster

- 10 Zu einer Mischung von 6 Gew. % Polyacrylsäure und 5 Gew. % Natriumpolyacrylat sowie 0,5 Gew. % Aerosil 200 werden 7 Gew. % Glykol gegeben. Diese Mischung wird unter Rühren homogenisiert. Anschließend wird die Mischung zu einer Lösung aus 0.03 Gew. % EDTA in 65 Gew. % Wasser gegeben. Dazu werden weitere 0,3 Gew. %
15 Polyoxyethylensorbitmonostearat unter Erwärmen auf 50 °C gegeben. Zuletzt wird das erfindungsgemäße nanoteilige Pulver in die Mischung gerührt und die Masse wird auf nichtgewobene Pflasterbasis aufgetragen.

20 9. Injizierbares Depotgel

10 Gew%. der erfindungsgemäßen Nanopartikel, 30 Gew. % eines Milchsäure-Glykol Copolymeren, 10 Gew. % Ethanol, 50 Gew. % isotonische Kochsalzlösung

25

10. Brausetablette

- 217 g Propafenon-Mikronisat gemäß Herstellbeispiel 3
200 g Kaliumhydrogencarbonat
30 205,7 g Citronensäure
142,1 g Instant-Zucker
32,0 g Macrogol 200
2 g Zitronenaroma
1,2 g Saccharin

35

Die Mischung wurde unter üblichen Bedingungen zu einer Tablette mit einer Dicke von 5,9 mm und einem Gewicht von 2,9 g verpresst. Zerfall in Wasser (Becherglas): 9 min.

40

45

Patentansprüche

1. Nanopartikuläre Zubereitungen von pharmazeutischen und kosmetischen Wirkstoffen mit einer Kern-Schale Struktur, in denen der Wirkstoff im Kern röntgenamorph zusammen mit einem oder mehreren Polymeren vorliegt und die Schale aus einer stabilisierenden Hüllmatrix besteht.
2. Zubereitungen nach Anspruch 1, in denen der Kern mindestens zwei getrennte Phasen aufweist, wobei die eine Phase aus amorphen Partikeln des Wirkstoffs besteht, und die andere Phase eine molekulardisperse Verteilung des Wirkstoffs in einer Polymermatrix darstellt.
3. Zubereitungen nach Anspruch 1, in denen der Kern mindestens zwei getrennte Phasen aufweist, wobei die eine Phase aus amorphem Wirkstoff besteht, und die andere Phase eine Wirkstoff-freie Polymermatrix darstellt.
4. Zubereitungen nach Anspruch 1 oder 2, enthaltend als Kernpolymere für pharmazeutische und kosmetische Anwendungen geeignete Polymere, welche in Wasser nicht oder nur teilweise löslich sind.
5. Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, enthaltend als Hüllmatrix peptidische Polymere.
6. Zubereitungen, enthaltend als Hüllpolymer Gelatine.
7. Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, enthaltend als Hüllmatrix Casein oder Natriumcaseinat.
8. Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, in denen die Kern-Schale-Strukturen einen mittleren Teilchendurchmesser zwischen 0,01 und 2 μm aufweisen.
9. Hydrosole der Zubereitungen gemäß einem der Ansprüche 1 - 8.
10. Hydrosole nach Anspruch 9, in denen die Teilchengrößen der nanopartikulären Hydrosolteilchen innerhalb der ersten Stunde nach Herstellung der Hydrosole um weniger als 50 % anwachsen.

26

11. Verfahren zur Herstellung von Zubereitungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Lösung des Wirkstoffs in einem zu mindestens 10 Gew.-% mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel herstellt, diese mit dem Kernpolymer oder einer Lösung des Kernpolymers in einem organischen Lösungsmittel vermischt, und die resultierende Mischung mit einer wässrigen Lösung des Hüllpolymers in Kontakt bringt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß beim Mischen der Wirkstoff-Lösung mit der Lösung der Kernpolymere eine Ausfällung der Kernpartikel erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß beim Vermischen mit der Lösung des Wirkstoffs der 2. Virialkoeffizient für die Kernpolymere einen Wert kleiner Null annimmt.
14. Verwendung der Zubereitungen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, zur Herstellung von pharmazeutischen und kosmetischen Darreichungsformen.

25

30

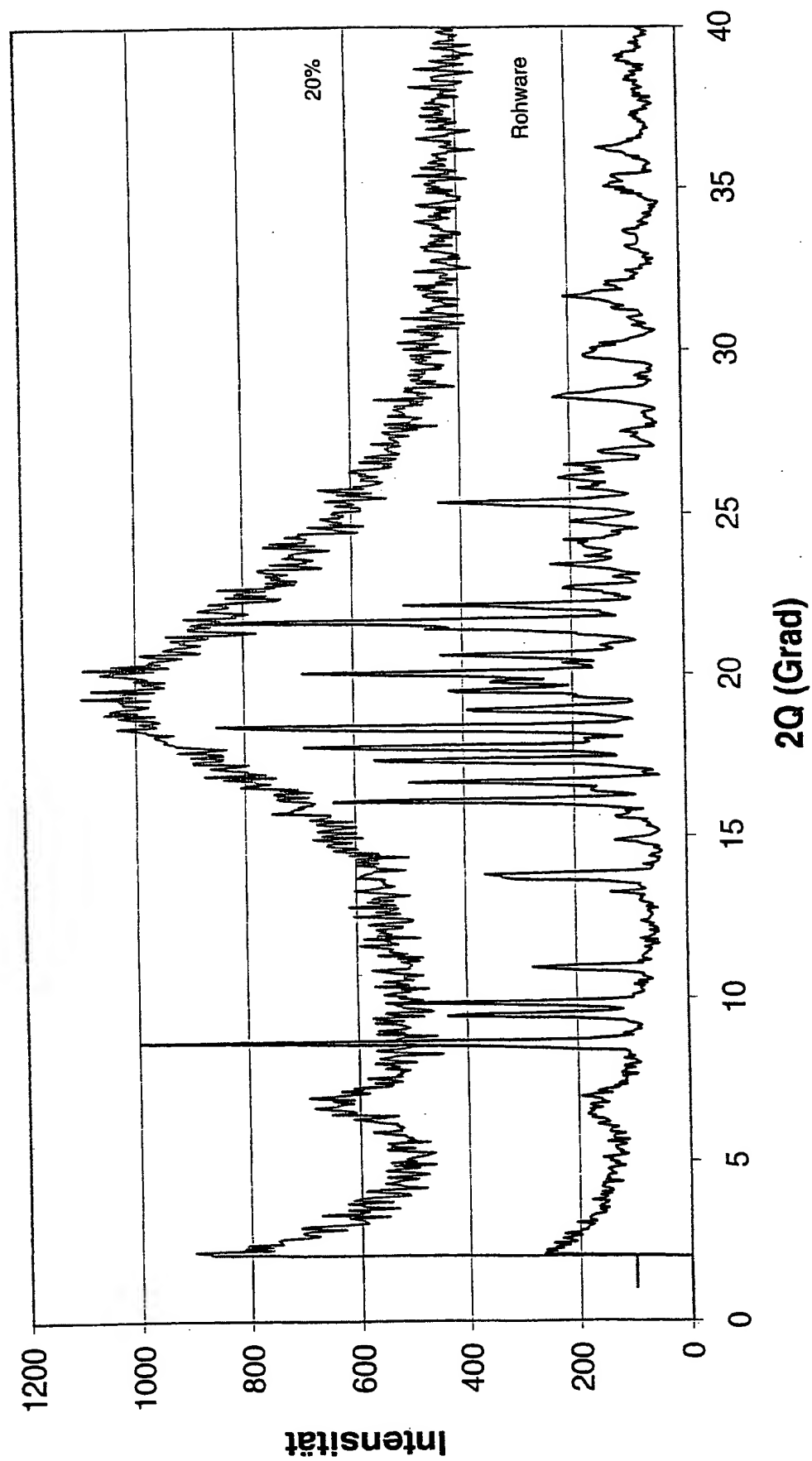
35

40

45

Ritonavir

Fig. 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIO SEARCH REPORT

Inte .onal Application No

PCT/EP 99/09545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/50 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 14174 A (VIVORX PHARMACEUTICALS INC., U.S.A.) 9 April 1998 (1998-04-09) claims 1, 4, 11-13, 15, 20-22, 24-26, 30-32, 34-36, 40-44, 46-48 page 30, line 1 - line 11 page 31, line 14 - page 32, line 3	1-14
A	WO 95 05164 A (K. WESTESEN ET AL.) 23 February 1995 (1995-02-23) claims 1, 8, 9, 11-14, 23, 27-30, 37, 46, 47, 49, 54-58 page 15, line 20 - line 23 --- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 2000

Date of mailing of the international search report

06/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/09545

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 275 796 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 27 July 1988 (1988-07-27) cited in the application claims -----	1-14
A	W0 93 25221 A (ALKERMES) 23 December 1993 (1993-12-23) claims 1-6, 10-15 page 4, line 11 -page 5, line 9 page 15, line 35 -page 16, line 14 example 4 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09545

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9814174 A	09-04-1998	US 5916596 A	29-06-1999
		AU 718753 B	20-04-2000
		AU 4592997 A	24-04-1998
		CN 1237901 A	08-12-1999
		EP 0961612 A	08-12-1999
		NO 991620 A	01-06-1999
WO 9505164 A	23-02-1995	DE 4327063 A	16-02-1995
		AT 192333 T	15-05-2000
		AU 7392694 A	14-03-1995
		DE 69424288 D	08-06-2000
		EP 0711151 A	15-05-1996
		JP 9502963 T	25-03-1997
EP 275796 A	27-07-1988	FR 2608988 A	01-07-1988
		AT 74024 T	15-04-1992
		CA 1292168 A	19-11-1991
		DE 3777796 A	30-04-1992
		ES 2031151 T	01-12-1992
		FR 2634397 A	26-01-1990
		GR 3004152 T	31-03-1993
		GR 3018122 T	29-02-1996
		JP 2739896 B	15-04-1998
		JP 63240936 A	06-10-1988
		US 5133908 A	28-07-1992
		US 5118528 A	02-06-1992
WO 9325221 A	23-12-1993	AU 698016 B	22-10-1998
		AU 4275597 A	15-01-1998
		AU 680422 B	31-07-1997
		AU 4630893 A	04-01-1994
		CA 2136434 A	23-12-1993
		EP 0644771 A	29-03-1995
		JP 7507806 T	31-08-1995
		US 5716644 A	10-02-1998
		US 5674534 A	07-10-1997

